

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 549 414 B1

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication et mention

de la délivrance du brevet:

18.09.1996 Bulletin 1996/38

(51) Int Cl.⁶: G01N 33/80, G01N 15/12

(21) Numéro de dépôt: 92403416.8

(22) Date de dépôt: 15.12.1992

(54) Procédé de numération des hématies ou des thrombocytes et dispositif de mise en oeuvre

Verfahren zur Zählung von Erythrozyten oder Plättchen und Einrichtung zur Durchführung des Verfahrens

Method for enumeration of erythrocytes or platelets and device for implementing said method

(84) Etats contractants désignés:

DE ES FR GB

(30) Priorité: 24.12.1991 FR 9116100

(43) Date de publication de la demande:

30.06.1993 Bulletin 1993/26

(73) Titulaire: Melet, François

F-95620 Parmain (FR)

(72) Inventeur: Melet, François

F-95620 Parmain (FR)

(74) Mandataire: Rinuy, Santarelli

14, avenue de la Grande Armée

75017 Paris (FR)

(56) Documents cités:

EP-A- 0 335 789

EP-A- 0 430 750

FR-A- 2 551 551

- DATABASE WPI Section Ch, Week 8005, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 80-08862

EP 0 549 414 B1

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

La présente demande concerne un procédé de numération des hématies ou des thrombocytes et son dispositif de mise en oeuvre.

Les appareils conventionnels de numération des éléments figurés du sang sont habituellement satisfaisants pour les échantillons de sang humain. On a ainsi une discrimination correcte en ce qui concerne les hématies et les thrombocytes. Il serait toutefois souhaitable d'améliorer encore cette discrimination en éliminant les possibilités d'interférence dans la numération de ces éléments.

Par ailleurs pour de nombreuses espèces d'animaux, la numération sanguine pose des problèmes. En effet, par exemple chez le chat la différenciation volumétrique des hématies et des thrombocytes est mauvaise étant donné que le volume des plus petites hématies et des plus gros thrombocytes sont comparables; de ce fait, lorsque la détection de ces éléments est réalisée selon une technique prenant en compte le volume desdits éléments telle que la numération réalisée à l'aide de compteurs automatiques utilisant le principe de mesure par impédance ou la mesure optique au laser, la numération donne des résultats erronés. Les appareils de l'état de la technique procèdent généralement à une numération de la totalité des thrombocytes et des hématies, et introduisent un seuil de détection arbitraire pour supprimer du comptage les plus gros éléments correspondant à la majeure partie, mais non la totalité, des hématies.

Il serait donc de plus souhaitable de disposer d'un procédé et d'un appareillage permettant une bonne discrimination des hématies et des thrombocytes quelle que soit la provenance de l'échantillon.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet un procédé de numération des hématies ou des thrombocytes, caractérisé en ce que l'on effectue sur un échantillon la numération globale des thrombocytes et des hématies, ajoute au dit échantillon un agent lysant les hématies, effectue la numération des seuls thrombocytes et si désiré en déduit par simple différence le nombre d'hématies.

Par numération globale des thrombocytes et des hématies, l'on entend que l'on effectue une numération de la totalité de ces éléments sans discrimination de l'un vis-à-vis de l'autre.

Par agent lysant les hématies l'on entend tout agent capable de briser substantiellement les hématies sans être par contre agressif pour les thrombocytes. De préférence l'agent de lyse est un agent tensio-actif, notamment un émulsifiant telle qu'une saponine. On peut citer par exemple les agents de lyse commercialisés sous les noms CYMET AUTOLYSE III DIFF, LYSERGLOBINE, LYSOGLOBINE et CYMET AUTOMATED. On retient notamment celui commercialisé par la Société MELET-SCHLOESING sous le nom d'ACTILYSER®.

Comme on l'a vu ci-dessus la discrimination entre

hématies et thrombocytes est habituellement satisfaisante chez l'homme, c'est pourquoi le procédé ci-dessus décrit sera de préférence mis en oeuvre sur un échantillon de sang provenant d'un animal tel qu'un palmipède, un batracien, un poisson, ou de préférence un mammifère autre que l'homme. On peut citer par exemple le cheval, le chat, le chien, et de manière plus générale les animaux domestiques, de ferme, de compagnie ou de zoos.

10 La présente invention vise toutefois également la numération du sang humain.

La présente demande a également pour objet un dispositif de numération adapté à la mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit dans lequel l'on met en oeuvre l'appareillage conventionnel de numération des lignées leucocytaire, érythrocytaire, et thrombocytaire caractérisé en ce que la partie de l'appareillage concernant la numération des éléments de la lignée érythrocytaire et thrombocytaire comprend un dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies.

Un type d'appareillage conventionnel est par exemple celui décrit dans la demande de brevet européen N° 0 335 789. Un tel dispositif de numération comprend notamment un dispositif de prélèvement et de distribution de sang total et d'un liquide de dilution, un circuit de sang dilué ou de liquide de dilution, un circuit de liquide détergent pour le nettoyage des cuves et des conduits et un circuit de liquide de lyse afin de détruire spécifiquement les érythrocytes. Ces circuits comportent une

25 cuve de dilution, une cuve de comptage des leucocytes associée à une cuve de liquide détergent, une cuve de comptage des hématies et des thrombocytes associée à une cuve de liquide détergent, une cuve de rinçage, une cuve de détermination de l'hémoglobine et une cuve 30 de déchets mise sous dépression ou pression par une pompe pneumatique.

35 L'enseignement de la demande de brevet européen précitée est introduit ici par référence.

Jusqu'à présent, un éventuel agent de lyse des hématies était mis en oeuvre uniquement pour permettre la numération des leucocytes sans interférence possible des hématies. De ce fait la partie de l'appareillage concernant la numération des éléments de la lignée érythrocytaire et thrombocytaire ne comprenait aucun dispositif permettant l'adjonction d'un agent de lyse des hématies dans l'échantillon à mesurer. Au contraire on considérait qu'il était même dangereux d'amener un agent de lyse des hématies dans les canalisations et cuves permettant précisément le comptage desdites hématies.

40 Dans des conditions préférentielles de réalisation du dispositif de numération ci-dessus décrit, le dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies est situé dans la cuve de numération globale des hématies et des thrombocytes.

45 Dans un autre mode de réalisation du dispositif ci-dessus décrit, la partie de l'appareillage destinée à la numération des hématies comporte successivement

deux éléments de détection et de comptage, une adjonction de produit de lyse étant réalisée entre les deux. Ainsi le premier élément effectue une numération globale des hématies et des thrombocytes alors que le second élément ne compte que les thrombocytes.

C'est, pourquoi la présente invention a ainsi pour objet un dispositif tel que ci-dessus décrit, caractérisé en ce que le dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies est situé dans la cuve de numération globale des hématies et des thrombocytes. La même cuve permet donc la mesure des hématies et des thrombocytes.

Dans encore un autre mode de réalisation, le dispositif ci-dessus décrit comporte deux circulations distinctes pour le cheminement des éléments des seules lignées érythrocytaire et thrombocytaire, l'une seule d'entre elles comportant un dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies.

C'est pourquoi la présente demande a encore pour objet un dispositif tel que ci-dessus décrit caractérisé en ce qu'il comporte deux circulations distinctes pour le cheminement des éléments des seules lignées érythrocytaire et thrombocytaire, l'une seule d'entre elles comportant un dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies.

Les exemples de réalisation qui suivent illustrent la présente invention :

Exemple 1. Numération réalisée sur un sang de chat sain

On introduit dans une cuve de dilution environ 20 µl de sang total d'un chat, effectue une première dilution environ au 1/200 à l'aide d'environ 10 ml d'un diluant isotonique de composition suivante :

EDTA	70 g
K Cl	64 g
Na Cl	172 g
Phosphate monopotassique	60 g
Phosphate disodique	60 g
Bicarbonate de sodium	18 g
Eau pour préparation injectable qsp	20 L

effectue sur cet échantillon une seconde dilution environ au 1/200, et transfère l'échantillon ainsi obtenu dans une cuve de comptage du type utilisé dans l'appareil MS 8 vétérinaire commercialisé par la Société MELET-SCHLOESING.

On envoie à l'aide d'une pompe l'échantillon dilué ci-dessus dans un élément de détection tel que ceux utilisés dans l'appareil MS 8 précité et obtient une première mesure qui est de 490 000 éléments par mm³. Il est utile à ce niveau de rappeler que cette mesure est censée correspondre à la numération classique des thrombocytes, la majeure partie des hématies ayant été électroniquement supprimée du résultat (voir notam-

ment l'appareil MS 8 vétérinaire précité) par coupure arbitraire de la détection au delà d'un certain volume des éléments.

On rajoute alors dans la même cuve de comptage

5 500 µl d'agent de lyse stérile (ACTILYSE^R ultrafiltrée), on mélange et effectue une seconde mesure comme ci-dessus. On obtient la valeur de 380 000 thrombocytes réels par mm³.

10 Conclusion

Une erreur d'environ 30 % est évitée sur une numération de thrombocytes dans ce cas.

15 Exemple 2 : Numération réalisée sur un sang de chat atteint de pyroplasmose .

On effectue les mesures comme ci-dessus et obtient dans ce cas, pour le premier comptage 170 000 20 éléments par mm³, (assimilés dans l'art antérieur au thrombocytes comme on l'a vu à l'exemple 1), et 55 000 thrombocytes par mm³ pour le second comptage.

Conclusion

25 Dans ce cas, l'objet de la présente demande évite une erreur de 200 % sur le comptage des thrombocytes. En effet en cas de pyroplasmose, on trouve très peu de plaquettes de faible volume ; de ce fait l'interférence est 30 importante entre les grosses plaquettes à mesurer et les plus petites hématies.

Revendications

35 1. Procédé de numération des hématies ou des thrombocytes, caractérisé en ce que l'on effectue sur un échantillon la numération globale des thrombocytes et des hématies, ajoute audit échantillon un agent lysant les hématies, effectue la numération des seuls thrombocytes et si désiré en déduit par simple différence le nombre d'hématies.

40 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent de lyse est un agent tensio-actif

45 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le tensio-actif est une saponine.

50 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'échantillon de sang provient d'un mammifère autre que l'homme.

55 5. Dispositif de numération pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 4 dans lequel l'on met en oeuvre l'appareillage conventionnel de numération des lignées leucocytaire, érythrocytaire, et thrombocytaire caractérisé en ce

que la partie de l'appareillage concernant la numé-
ration des éléments de la lignée érythrocytaire et
thrombocytaire comprend un dispositif d'arrivée
dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies.

6. Dispositif de numération selon la revendication 5, caractérisé en ce que le dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies est si-
tué dans la cuve de numération globale des héma-
ties et des thrombocytes.

7. Dispositif de numération selon la revendication 5, caractérisé en ce que le dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies est si-
tué en aval du système de numération globale des hématies et des thrombocytes.

8. Dispositif de numération selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comporte deux circulations distinctes pour le cheminement des éléments des seules lignées érythrocytaire et thrombocytaire, l'une seule d'entre elles comportant un dispositif d'arrivée dans l'échantillon d'un agent de lyse des hématies.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

1005

1010

1015

1020

1025

1030

1035

1040

1045

1050

1055

1060

1065

1070

1075

1080

1085

1090

1095

1100

1105

1110

1115

1120

1125

1130

1135

1140

1145

1150

1155

1160

1165

1170

1175

1180

1185

1190

1195

1200

1205

1210

1215

1220

1225

1230

1235

1240

1245

1250

1255

1260

1265

1270

1275

1280

1285

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

1345

1350

1355

1360

1365

1370

1375

1380

1385

1390

1395

1400

1405

1410

1415

1420

1425

1430

1435

1440

1445

1450

1455

1460

1465

1470

1475

1480

1485

1490

1495

1500

1505

1510

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

1570

1575

1580

1585

1590

1595

1600

1605

1610

1615

1620

1625

1630

1635

1640

1645

1650

1655

1660

1665

1670

1675

1680

1685

1690

1695

1700

1705

1710

1715

1720

1725

1730

1735

1740

1745

1750

1755

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

1795

1800

1805

1810

1815

1820

1825

1830

1835

1840

1845

1850

1855

1860

1865

1870

1875

1880

1885

1890

1895

1900

1905

1910

1915

1920

1925

1930

1935

1940

1945

1950

1955

1960

1965

1970

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

2105

2110

2115

2120

2125

2130

2135

2140

2145

2150

2155

2160

2165

2170

2175

2180

2185

2190

2195

2200

2205

2210

2215

2220

2225

2230

2235

2240

2245

2250

2255

2260

2265

2270

2275

2280

2285

2290

2295

2300

2305

2310

2315

2320

2325

2330

2335

2340

2345

2350

2355

2360

2365

2370

2375

2380

2385

2390

2395

2400

2405

2410

2415

2420

2425

2430

2435

2440

2445

2450

2455

2460

2465

2470

2475

2480

2485

2490

2495

2500

2505

2510

2515

2520

2525

2530

2535

2540

2545

2550

2555

2560

2565

2570

2575

2580

2585

2590

2595

2600

2605

2610

2615

2620

2625

2630

2635

2640

2645

2650

2655

2660

2665

2670

2675

2680

2685

2690

2695

2700

2705

2710

2715

2720

2725

2730

2735

2740

2745

2750

2755

2760

2765

2770

2775

2780

2785

2790

2795

2800

2805

2810

2815

2820

2825

2830

2835

2840

2845

2850

2855

2860

2865

2870

2875

2880

2885

2890

2895

2900

2905

2910

2915

2920

2925

2930

2935

2940

2945

2950

2955

2960

2965

2970

2975

2980

2985

2990

2995

3000

3005

3010

3015

3020

3025

3030

3035

3040

3045

3050

3055

3060

3065

3070

3075

3080

3085

3090

3095

3100

3105

3110

3115

3120

3125

3130

3135

3140

3145

3150

3155

3160

3165

3170

3175

3180

3185

3190

3195

3200

3205

3210

3215

3220

3225

3230

3235

3240

3245

3250

3255

3260

3265

3270

3275

3280

3285

3290

3295

3300

3305

3310

3315

3320

3325

3330

3335

3340

3345

3350

3355

3360

3365

3370

3375

3380

3385

3390

3395

3400

3405

3410

3415

3420

3425

3430

3435

3440

3445

3450

3455

3460

3465

3470

3475

3480

3485

3490

3495

3500

3505

3510

3515

3520

3525

3530

3535

3540

3545

3550

3555

3560

3565

3570

3575

3580

3585

3590

3595

3600

3605

3610

3615

3620

3625

3630

3635

3640

3645

3650

3655

3660

3665

3670

3675

3680

3685

3690

3695

3700

3705

3710

3715

3720

3725

3730

3735

3740

3745

3750

3755

3760

3765

3770

3775

3780

3785

3790

3795

3800

3805

3810

3815

3820

3825

3830

3835

3840

3845

3850

3855

3860

3865

3870

3875

3880

3885

3890

3895

3900

3905

3910

3915

3920

3925

3930

3935

3940

3945

3950

3955

3960

3965

3970

3975

3980

3985

3990

3995

4000

4005

4010

4015

4020

4025

4030

4035

4040

4045

4050

4055

4060

4065

4070

4075

4080

4085

4090

4095

4100

4105

4110

4115

4120

4125

4130

4135

4140

4145

4150

4155

4160

4165

4170

4175

4180

4185

4190

4195

4200

4205

4210

4215

4220

4225

4230

4235

4240

4245

4250

4255

4260

4265

4270

4275

4280

4285

4290

4295

4300

4305

4310

4315

4320

4325

4330

4335

4340

4345

4350

4355

4360

4365

4370

4375

4380

4385

4390

4395

4400

4405

4410

4415

4420

4425

4430

4435

4440

4445

4450

4455

4460

4465

4470

4475

4480

4485

4490

4495

4500

4505

4510

4515

4520

4525

4530

4535

4540

4545

4550

4555

4560

4565

4570

4575

4580

4585

4590

4595

4600

4605

4610

4615

4620

4625

4630

4635

4640

4645

4650

4655

4660

4665

4670

4675

4680

4685

4690

4695

4700

4705

4710

4715

4720

4725

4730

4735

4740

4745

4750

4755

4760

4765

4770

4775

4780

4785

4790

4795

4800

4805

4810

4815

4820

4825

4830

4835

4840

4845

4850

4855

4860

4865

4870

4875

4880

4885

4890

4895

4900

4905

4910

4915

4920

4925

4930

4935

4940

4945

4950

4955

4960

4965

4970

4975

4980

4985

4990

4995

5000

5005

5010

5015

5020

5025

5030

5035

5040

5045

5050

5055

5060

5065

5070

5075

5080

5085

5090

5095

5100

5105

5110

5115

5120

5125

5130

5135

5140

5145

5150

5155

5160

5165

5170

5175

5180

5185

5190

5195

5200

5205

5210

5215

5220

5225

5230

5235

5240

5245

5250

5255

5260

5265

5270

5275

5280

5285

5290

5295

5300

5305

5310

5315

5320

5325

5330

5335

5340

5345

5350

5355

5360

5365

5370

5375

5380

5385

5390

5395

5400

5405

5410

5415

5420

5425

5430

5435

5440

5445

5450

5455

5460

5465

5470

5475

5480

5485

5490

5495

5500

5505

5510

5515

5520

5525

5530

5535

5540

5545

5550

5555

5560

5565

5570

5575

5580

5585

5590

5595

5600

5605

5610

5615

5620

5625

5630

5635

5640

5645

5650

5655

5660

5665

5670

5675

5680

5685

5690

5695

5700

5705

5710

5715

5720

5725

5730

5735

5740

5745

5750

5755

5760

5765

5770

5775

5780

5785

5790

5795

5800

5805

5810

5815

5820

5825

5830

5835

5840

5845

5850

5855

5860

5865

5870

5875

5880

5885

5890

5895

5900

5905

5910

5915

5920

5925

5930

5935

5940

5945

5950

5955

5960

5965

5970

5975

5980

5985

5990

5995

6000

6005

6010

6015

6020

6025

6030

6035

6040

6045

6050

6055

6060

6065

6070

6075

6080

6085

6090

6095

6100

6105

6110

6115

6120

6125

6130

6135

6140

6145

6150

6155

6160

6165

6170

6175

6180

6185

6190

6195

6200

6205

6210

6215

6220

6225</

in that the device for introducing an erythrocyte lysis agent into the sample is situated downstream of the system for the overall count of erythrocytes and thrombocytes.

5

8. Counting device according to claim 5, characterized in that it contains two separate circuits for the flow of components of the single erythrocyte and thrombocyte lines, only one of them containing a device for introducing an erythrocyte lysis agent into the sample. 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55